Agilent LTM (Low Thermal Mass : 低熱容量) GC/MS システムとキャピラリ・フロー・テクノロジー、QuickSwap のバックフラッシュ機能を利用した多環芳香族炭化水素の高速分析

アプリケーションノート

環境

著者

Frank David
Research Institute for Chromatography
Pres. Kennedypark 26, B-8500 Kortrijk
Belgium

Matthew S. Klee
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

概要

LTM モジュールに取り付けたナローボア (内径 180-µm) カラムと QuickSwap によるキャピラリカラムのバックフラッシュを使用することで、分離能を落とすことなく、土壌や堆積物サンプルに含まれる多環芳香族炭化水素 (PAH) 類の GC/MS による分析時間を劇的に短縮することができました。アジレントのキャピラリ・フロー・テクノロジーにより、低揮発性物質をキャピラリカラムから除去するカラムバックフラッシュが可能になり、焼き出しやメンテナンスにかかる時間が短縮されました。このメソッドにより、分析性能を維持しながらサンプルの処理数とラボの生産性を上げることができました。

Agilent Technologies

はじめに

GC/MS システムによる多環 (多核) 芳香族炭化水素の分析は環境分析における重要なアプリケーションの 1 つです。ほとんどの標準メソッドでは、ナフタレン (最初の溶出物質、MW = 128) からベンゾ (g,h,I) ペリレン (最後の溶出物質、MW = 276) まで、特に毒性や発ガン性の高い 16 種類の PAH がモニターされます。PAH 類の分析では、30 m × 0.25 mm id × 0.25 µm の 5% フェニルジメチルシロキサンカラム (たとえば、Agilent HP-5MS や J&W DB-5MS カラムなど) を使用し、温度プログラムの開始温度を 40 ～ 50 °C、終了温度を 300 ～ 320 °Cに設定する20 ～ 30 分の分析時間というのが一般的です。したがって、PAH 類の分析は、U.S. EPA メソッド 525、625、および 8270 で分析対象とされる半揮発性化合物の沸点範囲全体を対象としています。上記各メソッドの分析対象化合物には、ポリ塩化ビフェニル (PCB) 類、フタル酸類、フェノール類、GC で分析可能な大部分の農薬類 (たとえば、有機塩素系農薬、トリアジン系農薬、有機リン剤など) が含まれます。PAH サンプルには、炭化水素燃料やオイルだけでなく、こうした化合物がさまざまな組み合わせで含有される可能性があるため、ターゲットとなる PAH の分析は複雑なものになります。正確な同定や定量を行うためには質量分析計を使用する必要があります。

ほとんどのラボにとって効率化と生産性の強化は重要です。このため、多くのラボが、分析時間の短いメソッドを使用してサンプルの処理数を増やすという方法に注目しています。このためには、カラム内径の小径化とオーブンの昇温プログラムの高速化が重要な選択肢となります。しかし、PAH 分析の大きな課題は、質量分析計では識別できない主要異性体 (たとえば、ベンゾ (b) フルオランテンとベンゾ (k) フルオランテン) を十分に分離することです。こうした異性体の分離にはクロマトグラフを使用しなければなりませんが、その際には、十分な分離能を備えたカラムを使用し、カラム流量や昇温速度の設定にも細かな注意を払う必要があります。このため、メソッドトランスレーションソフトウェア [1] のようなツールを利用して標準条件から適切にスケーリングする必要があります。

分子量の大きな PAH は、サンプル流路のコールドスポットや吸着の影響を受けやすくなります。カラム接続部、トランスファーライン、イオン源温度、注入口やカラム表面の活性に問題があると、すぐにピークテーリングが発生して感度が失われます。PAH 分析のターゲット化合物に極性はないと考えられますが、(堆積物抽出液などの) 汚いサンプルを分析する場合には、注入口、カラム、イオン源のメンテナンスを頻繁に行う必要があります。高温 (たとえば、300 °C以上) まで加熱可能なイオン源の使用とキャピラリカラムのバックフラッシュによってメンテナンスの頻度を大幅に減らすことができ、これによりデータ品質とラボの生産性は更に高まります。

本アプリケーションノートでは、標準的な PAH メソッドを内径 180-µm のカラムによる高速メソッドへ変換します。サンプルの処理数を上げるために、LTM (Low Thermal Mass : 低熱容量) オーブンモジュールを使用してカラムの加熱/冷却時間の短縮化を図りました。最後の PAH の溶出後にキャピラリカラムをバックフラッシュできる機能があると同時に、カラムの交換やシステムのメンテナンスにかかる時間を節約できることから、本アプリケーションノートでは、アジレントのキャピラリ・フロー・テクノロジー QuickSwap デバイスを使用しました。この結果、低揮発性マトリックス化合物を効率的に除去することができ、メンテナンスの間隔を大幅に延ばすことができました。

実験

溶質とサンプル

本実験には、16 種類の PAH を含む PAH 標準混合液をジクロロメタンで希釈したものを使用しました。混合テストサンプルの調製は、CH_2Cl_2/ベンゼンを溶媒とした PAH 混合液 (たとえば、米国ペンシルベニア州ベルフォンテの Supelco 社から購入した PAH 混合液、CAT No. 48905、2000 mg/mL など) をジクロロメタンで 1 ng/µL (1 ppm) の濃度に希釈するという形で行いました。

鉱油や PAH 類に汚染された土壌サンプルは環境検査ラボから入手しました。1 g の土壌を 20 mL のジクロロメタンで抽出しました (30 分の超音波処理)。ほとんどの環境検査ラボで行われている手順と同じように、この抽出液をろ過して直接分析しました。入手したサンプルの鉱油含有濃度は約 5 g/kg でした。各 PAH の濃度については、ピレンおよびフルオランテンの濃度は 150 mg/kg、分子量の大きな PAH の濃度は 5～10 mg/kg でした (たとえば、ベンゾ(a)ピレンの濃度は 9 mg/kg でした)。抽出液では、各濃度が 1/20 になります (たとえば、抽出効率を 100% と仮定した場合、ベンゾ(a)ピレンの濃度は 0.45 ng/µL になります)。

下水汚泥サンプル (BCR-088、ベルギー IRMM 社より購入) も分析しました。1 g の汚泥を 20 mL のジクロロメタンで抽出し、この抽出液をろ過して直接分析しました。入手したサンプルには、分子量の大きな PAH が約 1 mg/kg の濃度で含まれていました (抽出液でのベンゾ(a)ピレンの濃度は 0.05 ng/µL)。

GC/MS 条件

分析には、Agilent 7890A シリーズ GC システムと Agilent 5975C シリーズ MSD システムを組み合わせて使用しました。GC システムには、スプリット/スプリットレス注入口、QuickSwap デバイス + 17 cm × 110 µm id の不活性処理済みフューズドシリカリストリクタ (G3185-60363)、AUX EPC モジュール、および LTM カラムモジュールが装備されています。図 1 にシステム構成の模式図を示します。

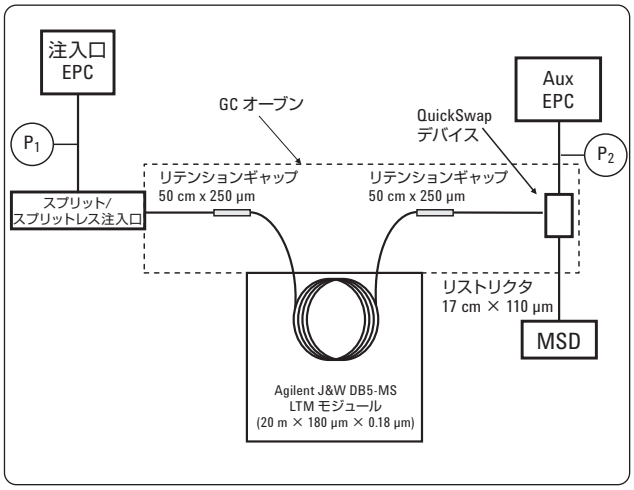

図 1. PAH の高速 GC 分析を行うためのシステム構成 (LTM モジュールと QuickSwap デバイスによるバックフラッシュを使用)。

対照用の標準分析には、GC オーブンに取り付けた 30 m × 0.25 mm id × 0.25 µm の Agilent J&W DB-5MS カラムを使用しました。高速メソッドには、20 m × 0.18 mm id × 0.18 µm の J&W DB-5MS カラム付の LTM モジュールを使用しました (部品番号 121-5522LTM)。スプリット/スプリットレス注入口からカラムへの接続と、カラムから QuickSwap 装置への接続に 50 cm × 250 µm id の不活性処理済みフューズドシリカチューブを 2 本使用しました。

バックフラッシュを用いた180-µm id カラムに関する最終的な条件を表 1 に示します。

表 1. LTM (Low Thermal Mass：低熱容量) オーブンおよび QuickSwap デバイスによるバックフラッシュを使用した高速 PAH 分析に関する GC/MS 条件

注入	1 µL、スプリットレスモード、280 °C
スプリット/スプリットレス圧力プログラム (He) (カラム注入口)	213 kPa (0.9 min)、60 kPa/min → 351 kPa、7.5 kPa/min →392 kPa (1.5 min)、600 kPa/min →10 kPa (6 min)
AUX 1 (QuickSwap デバイス、He) (カラム出口)	28 kPa (10 min)、600 kPa/min → 250 kPa (6 min)
GC オーブン温度	300 °C 恒温 (17 min)
LTM オーブンプログラム (標準メソッドより変換)	40 °C (0.9 min)、87 °C/min → 240 °C、11 °C/min →300 °C (8.35 min)
MS	選択イオンモニタリング(SIM)/スキャンモード
スキャン	50 ～ 300 m/z、サンプル数 = 21
SIM	表 2 を参照。
トランスファーライン	280 °C
溶媒ディレイ	2.70 min
MS 温度	イオン源 = 300 °C、四重極 = 150 °C
ランテーブルイベント	MS を 10 分でオフ。

表 2. SIM テーブル

グループ	開始時間 (min)	イオン (m/z)	ドウェルタイム (msec)
1	2.70	128	50
2	3.00	152, 153, 154, 165, 166	25
3	3.65	178	50
4	4.20	202	50
5	5.00	228	50
6	6.50	252	50
7	8.50	276, 278	50

結果と検討

対照用として、16 種類の PAH が 1 ppm の濃度で含まれるジクロロメタン混合溶液を 30 m × 0.25 mm id × 0.25 µm の一般的な J&W DB-5MS カラムで分析しました。カラムを 40 °C (2 分) から 40 °C/min の温度勾配で 240 °C まで加熱したのち、5 °C/min の温度勾配で 300 °C まで加熱 (11 分保持) するというプログラミングを使用しました。ジクロロメタンなどの低沸点溶媒を使用する場合には、カラム内での溶媒フォーカシングのために初期温度は低く設定しておくのが普通です。沸点の高い溶媒を使用する場合には初期温度の設定を高くすることもできます。初期温度を上げると GC の分析時間と冷却時間が短くなります。ただし、標準メソッドと同じ開始温度を使用しなければメソッドトランスレーションを高精度に行うことはできません。

標準混合液の標準クロマトグラムを図 2 に示します。ピークの近接した 2 つの化合物、ベンゾ (b) フルオランテンとベンゾ (k) フルオランテン (ピーク 11 と 12) は 15 分の時点で溶出し、定量に十分な分解能を保持しています。最後の溶質であるベンゾ (g,h,i) ペリレンは 19.7 分で溶出しました。

次に、GC メソッドトランスレーションソフトウェア [1] を使用して、標準メソッドを 20 m × 180 µm id × 0.18 µm のカラムに合わせたメソッドに変換しました。分離能はカラムの長さと半径に比例するため、このカラムの分離能は標準カラムの分離能とほとんど変わりません。メソッドトランスレーションソフトウエアに用意されている高速分析モード (いくつかのモードより選択可能) を用いて新しいカラムに合わせて注入口圧力とオーブン温度プログラムをスケーリングしました。メソッドトランスレーション後の条件を表 1 に示します。予想される分析の高速化は 2.17 倍でした。

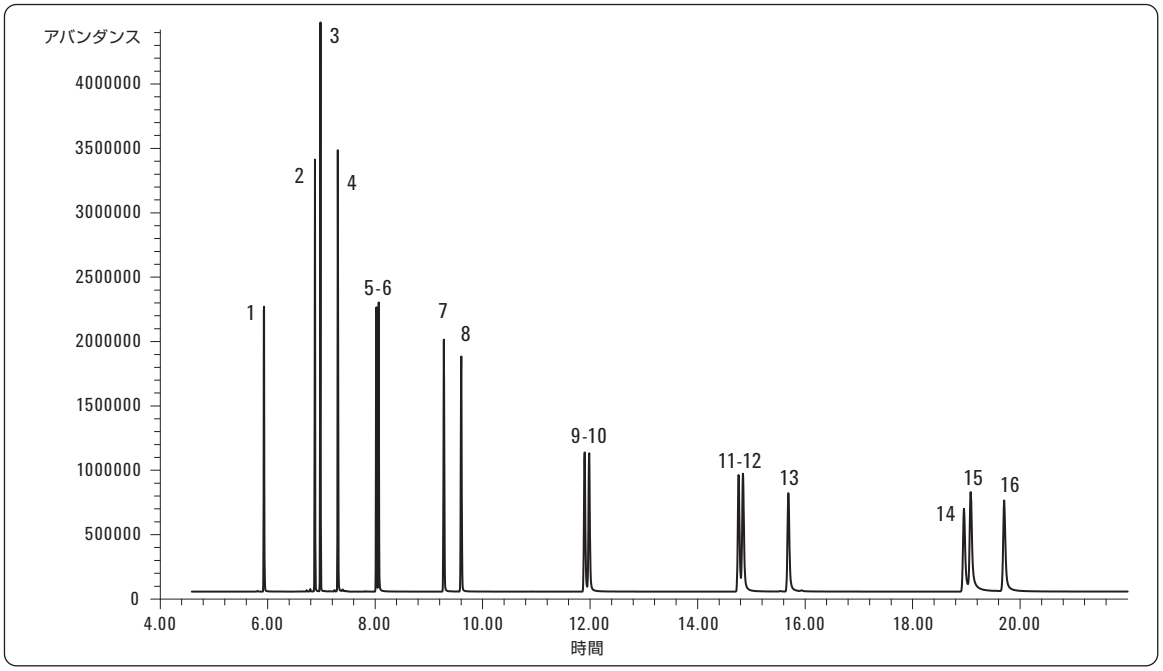

図2.　従来のシステム構成/メソッド条件による標準トータルイオンクロマトグラム。同定された化合物のリストは表 3 を参照。

高速メソッドによるクロマトグラムを図 3 に示します。このクロマトグラムを 図 2 のクロマトグラムと比較すると、ほぼ同じ分離能が約半分のリテンションタイムで得られることが分かります。ベンゾ (g,h,i) ペリレンは 9.3 分で溶出していますが、この時間は 9.1 分 (19.7 分/2.17) という予想リテンションタイムによく合致しています。予想通り、ベンゾ (b) フルオランテンとベンゾ (k) フルオランテンの分解能は標準カラムの分離能とほとんど変わりませんでした。分離能は同じで、分析時間は半分になりました。

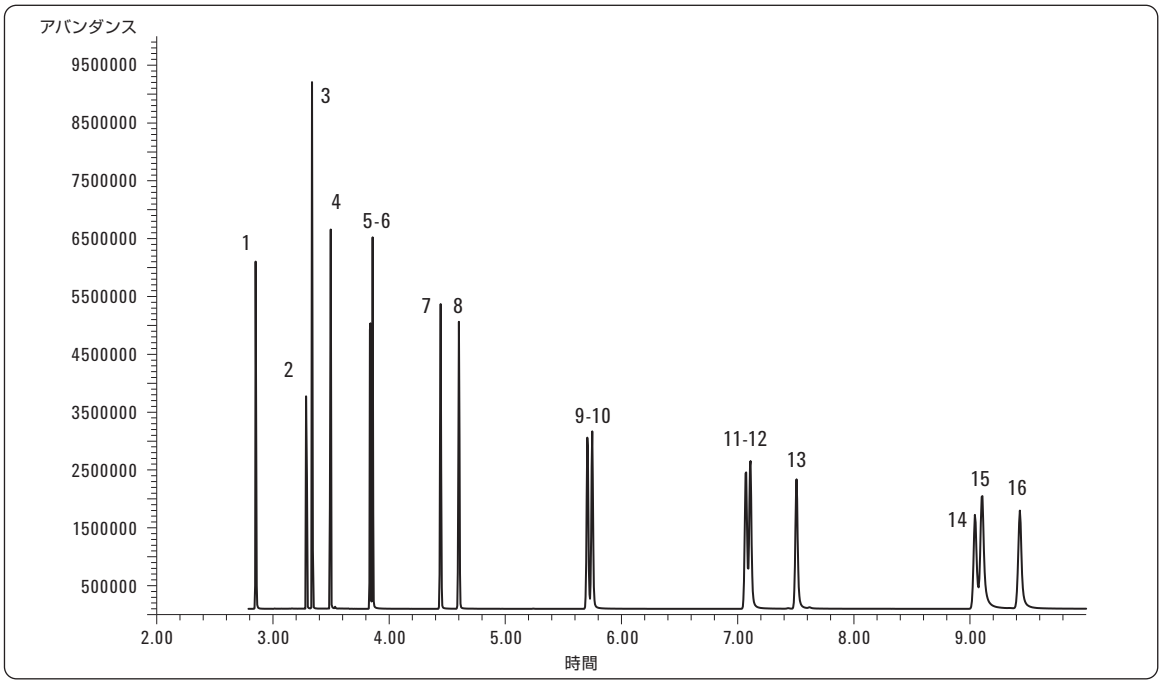

図 3.　高速 PAH メソッドによるクロマトグラム (20 m × 0.18 mm id × 0.18 µm の Agilent J&W DB-5MS LTM カラムを使用、10 分の時点でバックフラッシュを実行)。図は、SIM モードのクロマトグラム。

こうした条件を使用すれば、10 分の時点でバックフラッシュを開始できます。バックフラッシュを行うために、カラム温度を 300 °C に維持したまま、注入口圧力を 10 kPa に落として AUX 1、QuickSwap デバイス側の出口圧力 を 250 kPa に上げました。その結果、溶質が約 7 分で効率的にバックフラッシュされました。(上記の圧力条件下における) サンプル汚染物質 (鉱油) の効果的な除去にはこれだけの時間で充分であることが判明しました。バックフラッシュ中には質量分析計によるデータ取り込みは停止させておきました。

標準サンプルについて高速 GC/MS (SIM/スキャン) メソッドでバックフラッシュを使用した分析を 6 回連続で実行することにより、リテンションタイムとピーク面積の再現性を調べました。この結果を表 3 と表 4 に示します。リテンションタイムには優れた再現性が見られ、平均標準偏差は 0.001 分 でした (一般的な平均標準偏差は 0.01% 未満)。これは、LTM オーブン内のキャピラリカラムが均一に加熱されていることを確認するものです。また、ピーク面積にも優れた再現性が見られ (平均標準偏差は 2%)、標準的な GC/MS 条件でスプリットレスを使用した場合とほぼ同じ結果が得られました。

表 3. 高速分析メソッドを使用した場合の標的 PAH 化合物のリテンションタイムの再現性

溶出の順序	化合物名	平均 RT (min)	σ	相対標準偏差 (%)
1	ナフタレン	2.850	0.000	0.00
2	アセナフチレン	3.280	0.000	0.00
3	アセナフテン	3.326	0.000	0.00
4	フルオレン	3.481	0.000	0.00
5	フェナントレン	3.825	0.000	0.01
6	アントラセン	3.846	0.000	0.00
7	フルオランテン	4.429	0.001	0.01
8	ピレン	4.583	0.001	0.01
9	ベンゾ (a) アントラセン	5.654	0.001	0.02
10	クリセン	5.693	0.001	0.01
11	ベンゾ (b) フルオランテン	6.979	0.001	0.02
12	ベンゾ (k) フルオランテン	7.016	0.002	0.02
13	ベンゾ (a) ピレン	7.405	0.002	0.02
14	イデノ (1,2,3-c,d) ピレン	8.910	0.002	0.02
15	ジベンゾ (a,h) アントラセン	8.968	0.002	0.02
16	ベンゾ (g,h,i) ペリレン	9.278	0.002	0.02
		平均	**0.001**	**0.01**

表 4. 標的 PAH の面積再現性

溶出の順序	化合物名	平均 RT (min)	σ	相対標準偏差 (%)
1	ナフタレン	2145022	45438.72	2.12
2	アセナフチレン	2531734	57007.60	2.25
3	アセナフテン	3410703	76081.85	2.23
4	フルオレン	3108369	66651.55	2.14
5	フェナントレン	2341505	50290.78	2.15
6	アントラセン	2304885	46774.62	2.03
7	フルオランテン	2598819	57961.99	2.23
8	ピレン	2678698	58471.60	2.18
9	ベンゾ (a) アントラセン	2264966	58416.06	2.58
10	クリセン	2597444	50507.12	1.94
11	ベンゾ (b) フルオランテン	2245073	50491.19	2.25
12	ベンゾ (k) フルオランテン	2954729	71902.33	2.43
13	ベンゾ (a) ピレン	2239967	57434.91	2.56
14	イデノ (1,2,3-c,d) ピレン	1616395	56133.34	3.47
15	ジベンゾ (a,h) アントラセン	3065828	86273.62	2.81
16	ベンゾ (g,h,i) ペリレン	2511598	65387.08	2.60
			平均	**2.37**

次に、実際のサンプル抽出液を高速メソッドで分析し、ベンゾ (g,h,i) ペリレンの溶出から 10 分後にバックフラッシュを適用しました。スキャンモードと SIM モードのクロマトグラムを図 4 と図 5 に示します。クロマトグラム (図 4) には、サンプルの鉱油汚染による高いバックグラウンド干渉が見られます。10 分の時点で発生したシグナル降下がバックフラッシュの開始を明確に示しています。このあとの検査結果を見れば分かる通り、バックフラッシュを適用しなかった場合、鉱油の「丘」は 24 分以降 (300 °C の終了温度) まで続きます。

図 5 の SIM クロマトグラムは、サンプル内の PAH の存在を明確に示しています (フェナントレンからピレンまでは高濃度で、溶出の遅い PAH は低濃度で存在します。埋め込み図を参照)。

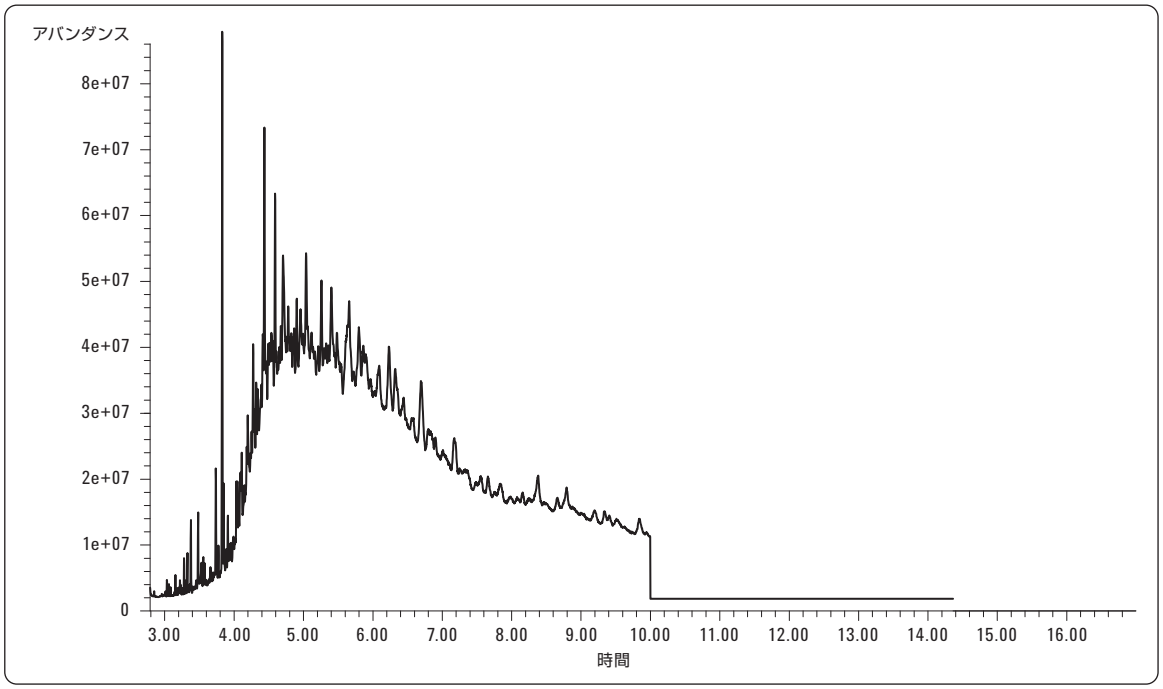

図 4. サンプル (土壌抽出液) のトータルイオンクロマトグラム (高速メソッドを使用して 10 分の時点でバックフラッシュを適用した場合)。図は、スキャンモードのトータルイオンクロマトグラム (TIC)

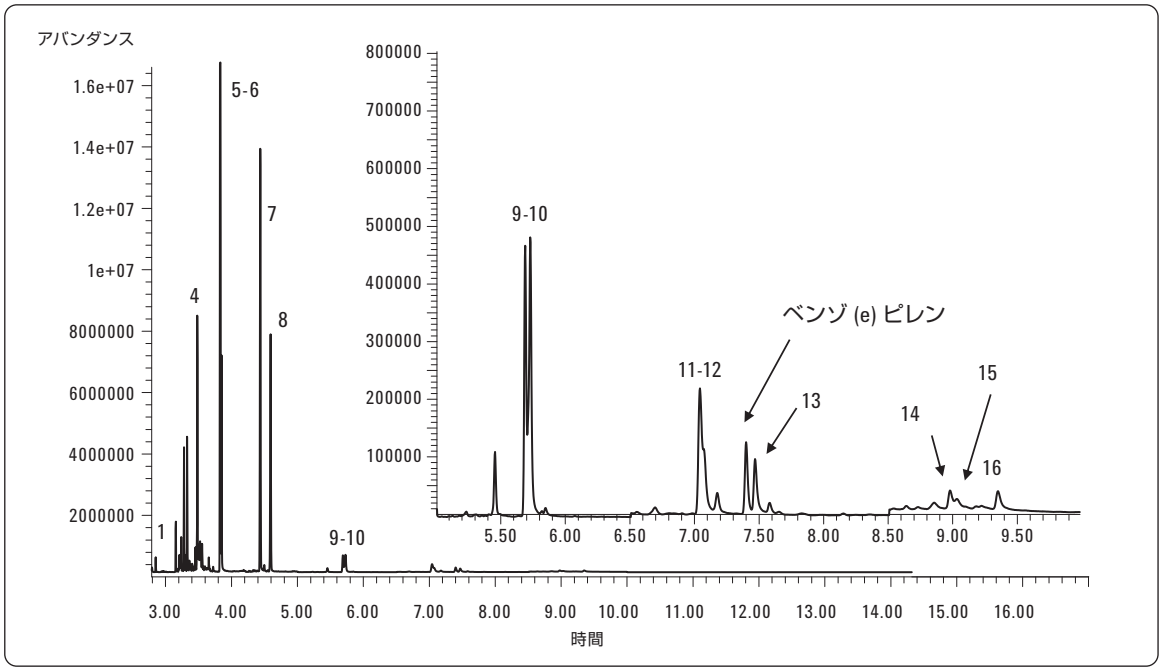

図 5. サンプル (土壌抽出液) のトータルイオンクロマトグラム (高速メソッドを使用して 10 分の時点でバックフラッシュを適用した場合)。見やすいように SIM クロマトグラムの後半部分を拡大した図。

バックフラッシュを伴ったサンプル分析のあとにブランクランを実行しました。このブランクランで得られた図 6 のクロマトグラムでは、顕著なピークは見られず、バックグラウンドはフラットになっています。バックフラッシュによって残留鉱油汚染が効果的に除去されたことが分かります。

高速 GC 分析 (特に、87 °C/min の温度プログラミング) と SIM/スキャンモードでの質量分析計データの取り込みを組み合わせれば、個々のピークについて精密な同定や定量に十分なデータポイントが得られるか疑問に思うかもしれません。表4 のピーク面積の再現性は、Agilent 5975C シリーズ MSD システムによる検出がスピードと再現性に優れたものであることを明確に示しています。

これについては、図 7 (環境サンプルからのベンゾ (a) ピレンの検出に関する AMDIS レポート) に詳しく示します。この実験のために、AMDIS [2] を使用して (図 3 の) スキャンデータを分析しました。図 7 の一番上のウィンドウは、トータルイオンクロマトグラム (TIC) と抽出イオン (m/z 252) クロマトグラムを重ね合わせたものです。上から 2 つ目のウィンドウを見ると、このピークについて 10 回を超えるスキャンが行われたことが分かります。下の 2 つのウィンドウには、生のスペクトルとデコンボリューション加工済みのスペクトルが示され、サンプル内のベンゾ (a) ピレンの存在がはっきりと確認できます。高いバックグラウンド干渉があったにもかかわらず、微量の PAH を正確に検出、確認できました。

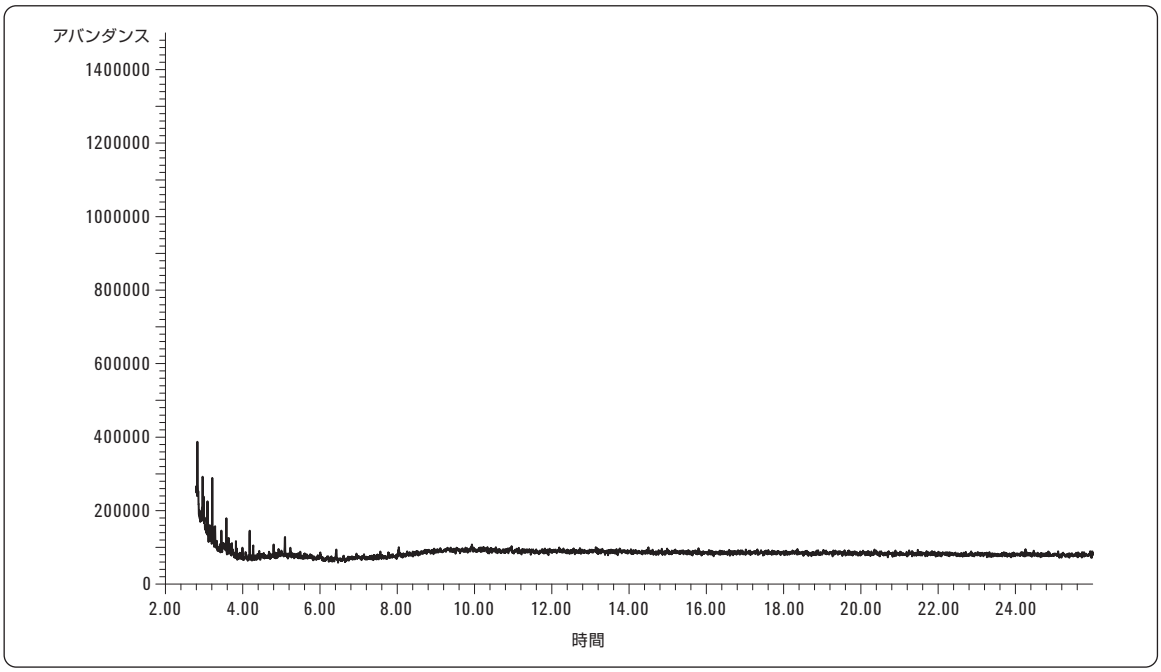

図 6. SIM/スキャンモードでのブランクランのクロマトグラム (バックフラッシュを使用したサンプル抽出液の分析後に実行)。スキャンクロマトグラムは汚染のないきれいなベースラインを示しています。

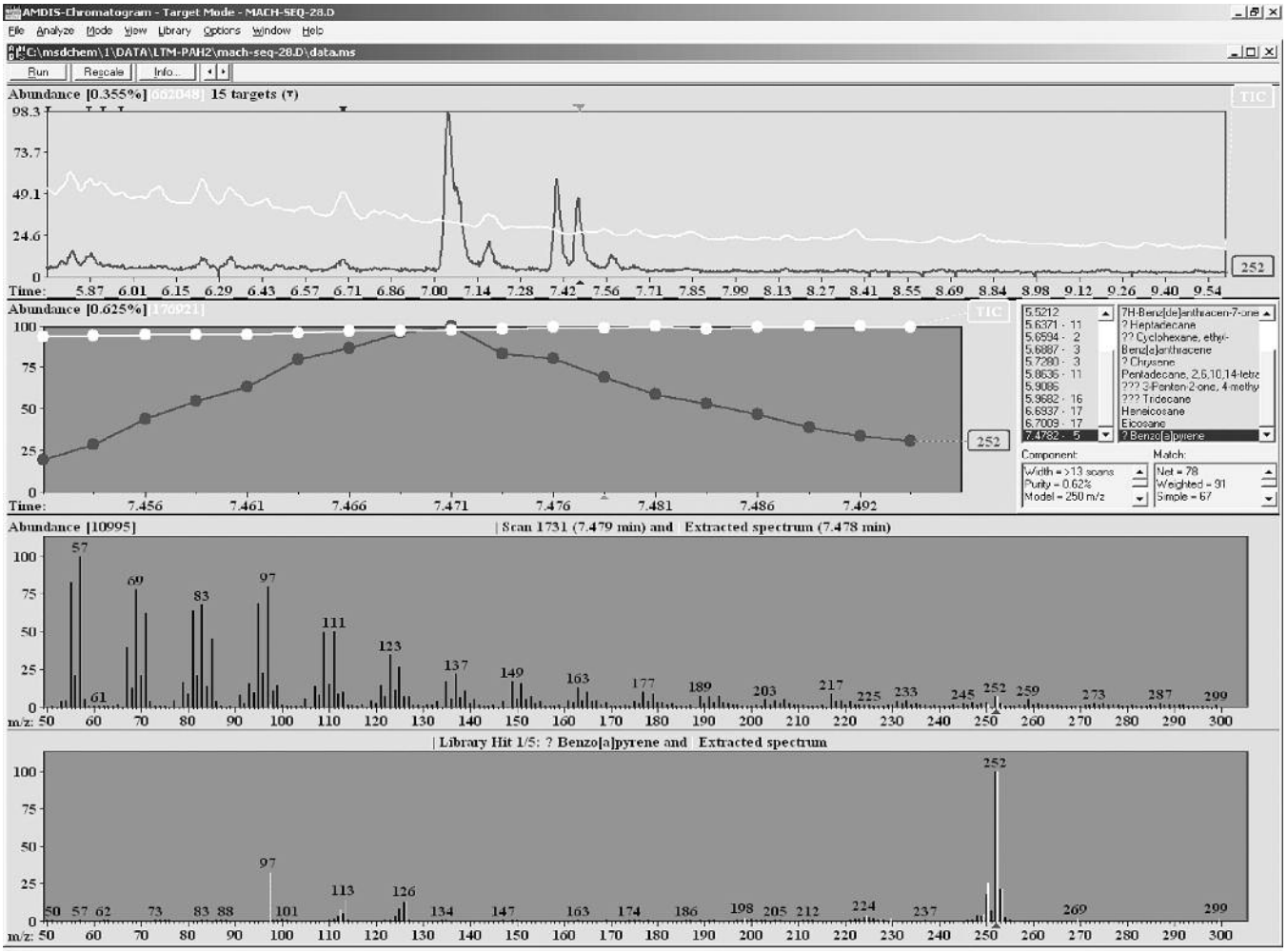

図 7.　鉱油の混在する土壌抽出液からのベンゾ(a)ピレンの検出に関する AMDIS レポート

残留サンプルの解消に対するバックフラッシュの効果を示すために、バックフラッシュなしで追加ランを連続的に実行しました。LTM オーブンモジュールを 300 °C まで加熱してから 11 分間保持するというプログラミングに基づいてサンプル抽出液を分析しました (合計分析時間は 17 分)。TIC クロマトグラムの一例を図 8 に示します。これを見れば、鉱油のピークの裾が 17 分の時点 (およびそれ以降) まで続いていることが分かります。

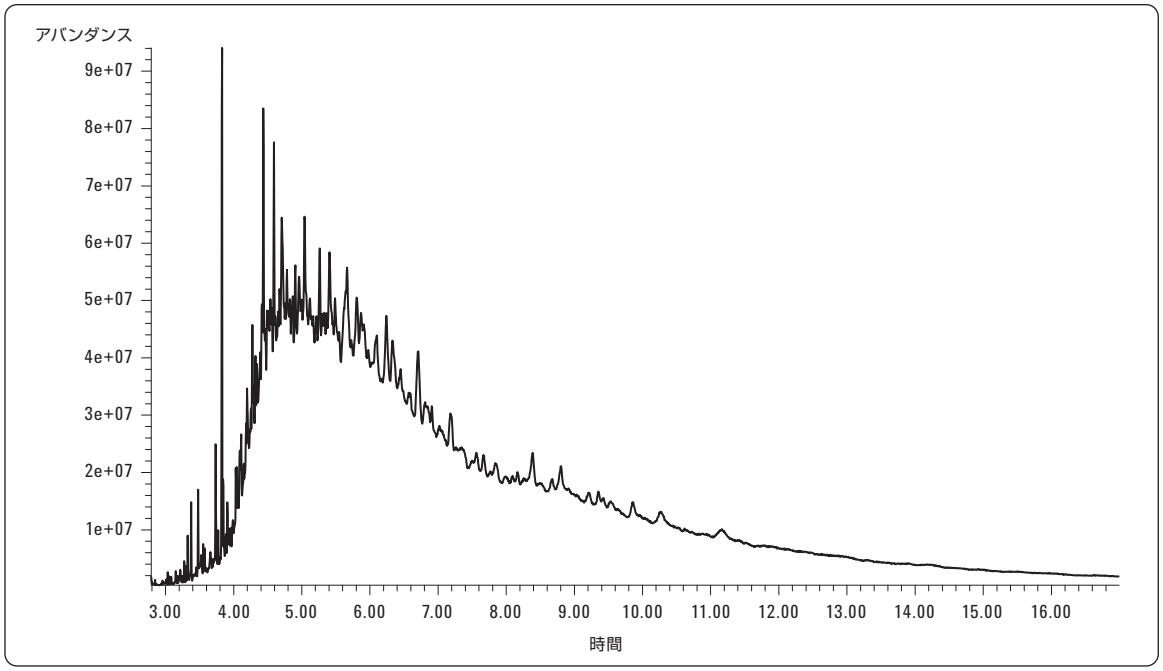

図 8. バックフラッシュなしで分析した土壌抽出液。トータルイオンクロマトグラムは、抽出液の鉱油含有量が高いことを示しています。

次に、ブランクランを 1 回実行しました。図 9 のクロマトグラムは、たとえオーブンを長時間高温に保持したとしてもカラム内には相当な量の鉱油が残留していることを示しています。(同じスケールでプロットされた) 図 9 の上下 2 つのクロマトグラムを比較すれば、バックフラッシュの効果は明白です。

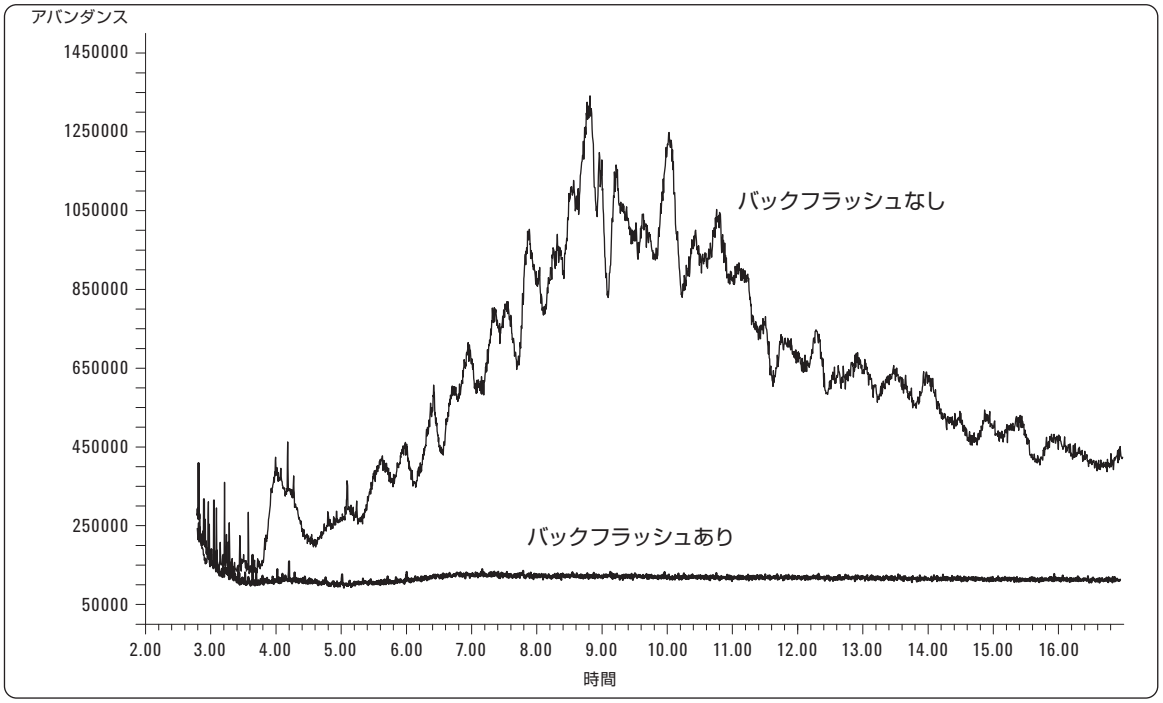

図 9. バックフラッシュなしで土壌抽出液の分析 (図7) を行ったあとのブランクラン。上の TIC クロマトグラムは、ランのあとにカラムに残留するマトリックスのバックグラウンドが高いことを示しています。下のクロマトグラムは、図 6 (バックフラッシュを適用した高速メソッドのあとで行ったブランクラン) のクロマトグラムです。

次に、バックフラッシュなしでサンプル抽出液を分析したあとに標準混合液の分析を行いました。図 10 に示した標準混合液に関する TIC クロマトグラムには、各 PAH ピークの最中および前後に残留サンプルによる干渉が見られます。メソッドにバックフラッシュ機能が含まれている場合には、こうした汚染は見られません。

下水汚泥の抽出液の分析も行いました。汚泥は、低揮発性の工場物質、フタル酸類、リニア・アルキル・スルホン酸塩 (LAS) 類で汚染されたものです。最初に 1 ppm の PAH 標準サンプルの分析を行い、次にバックフラッシュ機能を使用した下水汚泥抽出液の分析を 10 回繰り返してから標準サンプルの分析を 1 回実行し、さらにバックフラッシュなしで下水汚泥抽出液の分析を 10 回繰り返してから最後に標準サンプルの分析を行いました。各標準サンプルのクロマトグラムを重ね合わせたものを図 11 に示します。サンプル分析を繰り返す前後にバックフラッシュ機能を使用した標準サンプルに関する 2 つのクロマトグラムは非常によく一致し、ゴーストピークのない低いベースラインを示しています。バックフラッシュなしのサンプル分析を 10 回繰り返したあとで行った、最後の標準サンプルに関するクロマトグラムでは、バックグラウンドが大幅に増加し、ゴーストピークも見られます。

この検査結果から、カラムを 300 °C で 7 分間維持するという標準プロセスでは低揮発性物質を除去できないことが分かります。バックフラッシュを行えば、この物質を効果的に除去できます。バックフラッシュの実行によって、データの品質が高まるだけでなく、汚染物質の蓄積がなくなるためカラムのトリミング (先端の除去) を行う必要もほとんどなくなります。カラムのトリミングは、こうした抽出液をバックフラッシュなしで分析する場合には定期的に実施しなければならないメンテナンス作業です。LTM モジュールではカラムをトリミングできないため、汚れたサンプルを LTM モジュールで扱うことは不安を伴う行為でしたが、本アプリケーションノートで紹介した手法では、その懸念を軽減することができます。

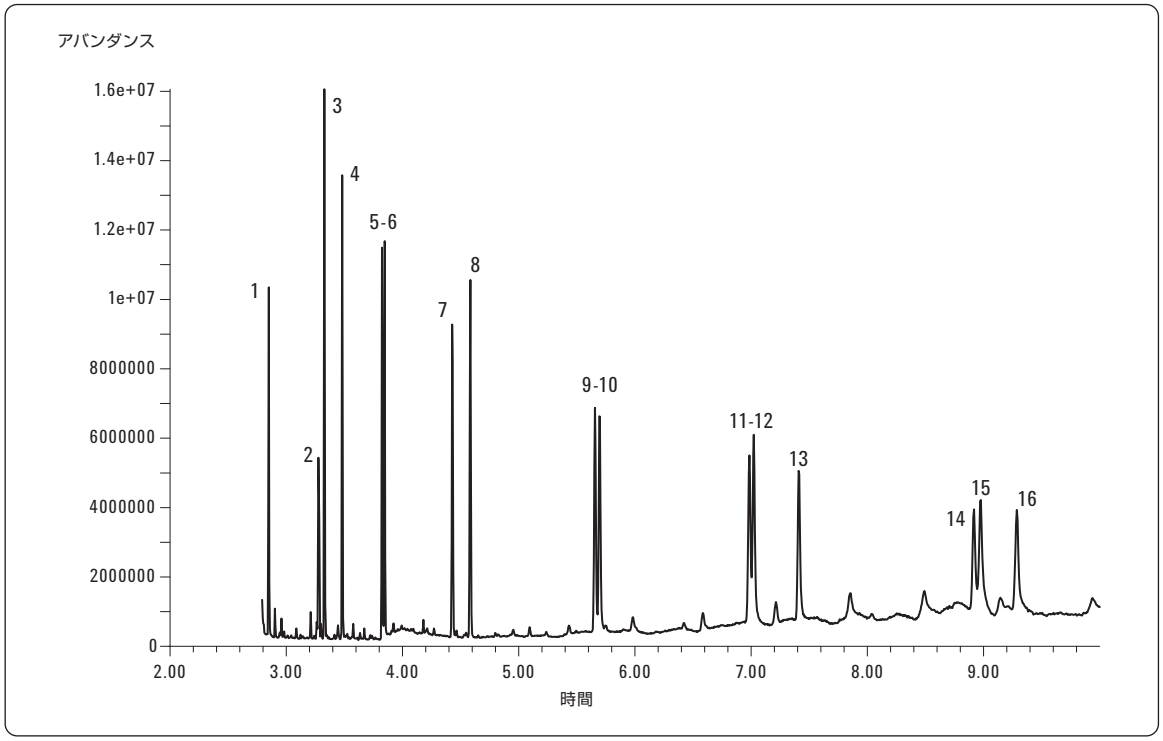

図 10. 1 ppm の PAH 標準混合液に関する GC/MS トータルイオンクロマトグラム (バックフラッシュなしでサンプル抽出液を分析した後で行った分析の結果)

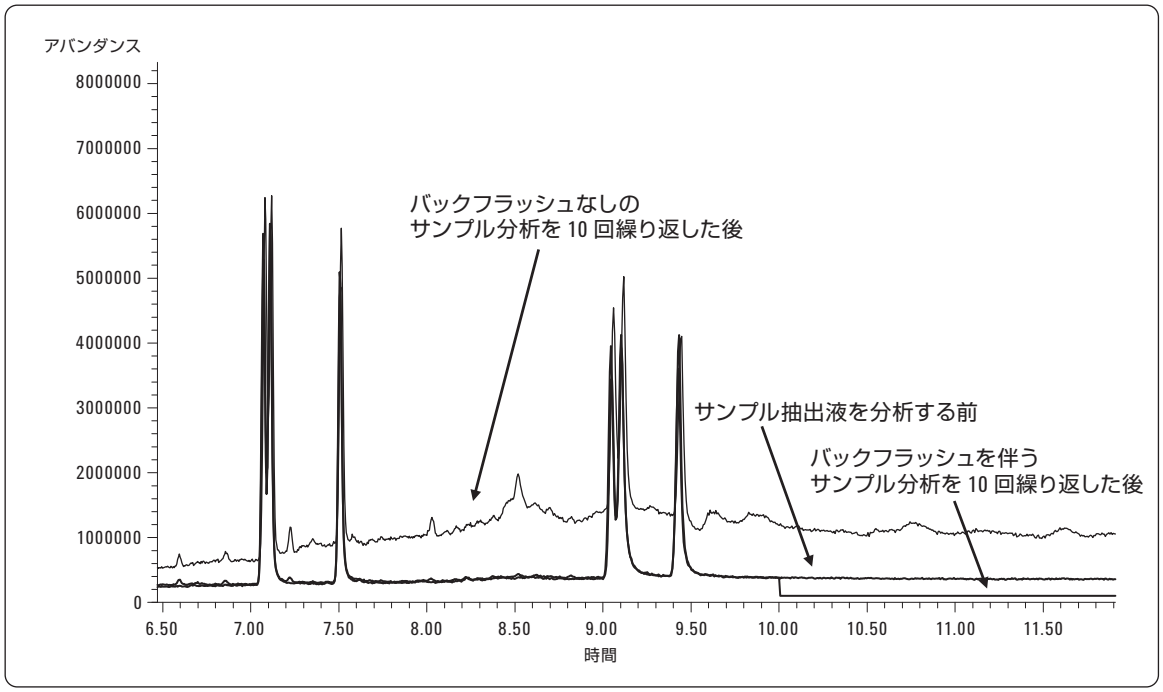

図 11.　標準的な分析によるクロマトグラム (バックフラッシュを伴った下水汚泥抽出液の分析の前後、およびバックフラッシュなしの下水汚泥抽出液の分析の後に行った分析)

分析時間の改善に関する最終的な評価を行った結果、LTM カラムモジュールの使用には、(高速冷却機能の有無にかかわらず) 従来の 7890A GC システムを使用した場合と比較して、冷却時間を約 30% 短縮できるという効果もあることが明らかになりました。高速な昇温条件による時間の節約やバックフラッシュによる実行時間の短縮だけでなく、冷却時間の短縮によって全体的なサイクルタイムをさらに 1 分縮めることができます。

結論

PAH 類の分析に関する標準的な 25 分のメソッドを、LTM カラムモジュールでナローボアカラムを使用する高速な GC/MS メソッドに変換しました。変換後の高速 GC メソッドは、主要異性体の分離能とメソッド全般の性能指標を維持しながら、すべての PAH の溶出について分析時間を 10 分以内に短縮しました。

キャピラリ・フロー・テクノロジー QuickSwap のバックフラッシュ機能は、分子量の大きなサンプルマトリックスを効果的に除去し、LTM カラムのカラムトリミングに関する従来の懸念を解消するものです。LTM モジュールを用いた新たな高速 GC メソッドでは、高速分析、バックフラッシュ、高速冷却を同時に実現できるため、データ品質を維持、改善しながらサンプルの処理数とラボの生産性を大幅に向上させることができます。

参考資料

1. http://www.chem.agilent.com でダウンロードできる GC メソッドトランスレーションソフトウェア。
2. AMDIS は NIST 質量スペクトルライブラリのアドオンです。詳しくは、http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/ をご覧ください。

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published in the Japan
April 1, 2009
5990-3451JAJP

Agilent Technologies